

2. 調査開始時と1年後におけるPIIは、自立高齢者がそれぞれ平均 1.1 ± 0.9 と 1.1 ± 0.6 、要介護高齢者がそれぞれ平均 1.0 ± 1.1 と 0.9 ± 0.8 であった。

3. 自立高齢者における1人あたりの口腔微生物検出種数は、調査開始時に平均 3.0 ± 1.3 種であったが、1年後では平均 4.3 ± 1.7 種と有意に高値を示した。要介護高齢者における1人あたりの口腔微生物検出種数は、調査開始時で平均 3.3 ± 1.5 種、1年後で平均 3.5 ± 1.6 種であり、両調査間で差がみられなかった。

4. 自立高齢者、要介護高齢者ともに好気性微生物では *Candida* sp.、嫌気性微生物では *Prevotella melaninogenica* が最も高率に検出された。さらに両群ともに、好気性微生物に比べ嫌気性微生物で検出率が高いものが多く認められた。

5. 義歯を装着している要介護高齢者で *Candida* sp. の検出率が高かった。また、自立高齢者では1日の義歯洗浄回数と微生物検出率とで有意な関連がみられた。

文 献

- 1) 岩倉政城, 安野陽子, 志村匡代ほか: 胃集団健診結果と口腔状態の関係について. 口腔衛生会誌 42: 452-453, 1992.
- 2) DeStefano F, Anda RF, Kahn HS et al.: Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality. BMJ 306: 688-691, 1993.
- 3) George WT, Walter JL, Margaret ST: Impact of oral diseases on systemic health in the elderly: Diabetes mellitus and aspiration pneumonia. J Public Health Dent 60: 313-320, 2000.
- 4) 佐々木英忠, 中山勝敏, 鎌仲正人: 誤嚥性肺炎のメカニズムと最近の知見. 歯界展望 91: 1280-1287, 1998.
- 5) 米山武義: 口腔ケアの今日的とらえ方と誤嚥性肺炎予防. 歯界展望 91: 1276-1479, 1998.
- 6) Granton JT, Grossman RF: Community-acquired pneumonia in the elderly patient. Clinical features, epidemiology, and treatment. Clin Chest Med 14: 537-553, 1993.
- 7) Niederman MS: Nosocomial pneumonia in the elderly patient. Chronic care facility and hospital considerations. Clin Chest Med 14: 479-490, 1993.
- 8) Ely EW, Haponik EF: Pneumonia in the elderly. J Thorac Imaging 6: 46-61, 1991.
- 9) Marrie TJ, Durant H, Yates L: Community-acquired pneumonia requiring hospitalization: 5-year prospective study. Rev Infect Dis 11: 586-599, 1989.
- 10) Bates HJ, Campbell GD, Barron AL: Microbial etiology of acute pneumonia in hospitalized patients. Chest 101: 1005-1012, 1992.
- 11) 新里 敬, 斎藤 厚: 呼吸器感染症における口腔内常在菌の意義. メディヤサークル 39: 189-195, 1994.
- 12) 斎藤 厚, 河野 茂: 呼吸器感染症における口腔内常在細菌の意義—とくに嫌気性菌について—. Prog Med 9: 15-19, 1989.
- 13) 三宅洋一郎: 口腔粘膜. Today's Therapy 2: 5-8, 1995.
- 14) 奥田克爾: 老人性肺炎と口腔細菌. 日歯医師会誌 49: 4-12, 1996.
- 15) 弘田克彦, 米山武義, 太田昌子ほか: プロフェッショナル・オーラル・ヘルス・ケアを受けた高齢者の咽頭細菌数の変動. 日老医誌 34: 125-129, 1996.
- 16) 米山武義: 誤嚥性肺炎予防における口腔ケアの効果. 日老医誌 38: 476-477, 2001.
- 17) Margaret ST, George WT, Dennis EL, et al.: Aspiration pneumonia: Dental and oral risk factors in an older veteran population. Am Geriatr Soc 49: 557-563, 2001.
- 18) 泉福英信, 十亀 輝, 由川英二ほか: 特別養護老人ホーム等施設内高齢者の口腔バイオフィルム内細菌群と全身疾患との関連. Bacterial Adherence 研究 14: 21-26, 2000.
- 19) 泉福英信: 口腔バイオフィルム感染症と全身の健康. 歯科評論 61: 61-66, 2001.
- 20) Silness J, Loe H: Periodontal disease in pregnancy 2 Correlation between oral hygiene and periodontal condition. Acta Odont Scand 22: 121-135, 1964.
- 21) 山本為之: 総義歯臼歯部人工歯の配列について(その2) —特に反対咬合について—. 補綴臨床 5: 395-400, 1972.
- 22) 厚生労働省医政局歯科保健課編: 平成11年歯科疾患実態調査報告—厚生省健康政策局調査—, 口腔保健協会, 東京, 第1版, 2001, 81頁.
- 23) 中垣晴男, 丹羽源男, 神原正樹: 臨床家のための口腔衛生学, 永末書店, 京都, 第1版, 1996, 191頁.
- 24) 奥田克爾: 新口腔感染症とアレルギー, 一世出版, 東京, 2000, 311頁.
- 25) Bartlett JG, Gorbach SL, Finegold SM: The bacteriology of aspiration pneumonia. Am J Med 56: 202-207, 1974.
- 26) Lorber B, Swenson RM: Bacteriology of aspiration pneumonia. Ann Intern Med 81: 329-331, 1974.
- 27) Rosenthal S, Tager IB: Prevalence of gram-negative tods in the normal pharyngeal flora. Ann Intern Med 83: 355-357, 1975.
- 28) 品田佳世子, 寺岡加代, 浅香次夫ほか: 高齢者の *Candida* と *Mutans Streptococci* の口腔内分布および口腔環境との関連性について. 口病誌 64: 512-517, 1997.
- 29) 池邊一典, 喜多誠一, 吉備政仁ほか: 要介護高齢者の義歯への *Candida* 菌付着状況—生活環境, 痴呆および就寝時の義歯装着による影響—. 老年歯学 12: 213-219, 1998.
- 30) 武藤隆嗣, 譽田英喜, 前田伸子ほか: 長期療養者ならびに寝たきり者の口腔常在微生物叢に関する研究. 口腔衛生会誌 50: 351-360, 2000.

著者への連絡先: 高田将成 〒102-8159 東京都千代田区富士見1-9-20 日本歯科大学歯学部衛生学講座
TEL: 03-3261-8792
FAX: 03-3261-8796

原 著

地域在住高齢者の食欲と QOL との関連

葭原 明弘 清田 義和 片岡照二郎 花田 信弘* 宮崎 秀夫

概要：日常の楽しみごととして食事をあげる高齢者は多い。本調査では、食欲と QOL の関連をほかの要因を考慮しながら評価することを目的としている。本調査の対象者は 70 歳の高齢者 600 人である。QOL を総合的にあらわす指標としてフェイススケールを用いた。生活満足状況について 5 つの顔の表情を示し、一番実感に近いものを選択してもらった。食欲については質問紙法により情報を得た。さらに、身体的要因、健康行動、社会的要因、口腔内症状について情報を得た。フェイススケールの結果にもとづき、食欲、口腔内症状の合計数およびほかの全体的要因との関連をロジスティック回帰分析により評価した。その際、従属変数をフェイススケールの分布にもとづき 2 種類のモデル (モデル 1, モデル 2) を作成した。いずれのモデルにおいても食欲、口腔内症状の合計数、老研式活動能力指標、睡眠時間および性別を独立変数に採用した。その結果、モデル 1 では、食欲 (オッズ比 : 2.77, $p < 0.05$)、口腔内症状の合計数 (オッズ比 : 1.25, $p < 0.05$)、老研式活動能力指標 (オッズ比 : 1.25, $p < 0.01$) が統計学的に有意であった。一方、モデル 2 では、食欲 (オッズ比 : 3.23, $p < 0.001$)、老研式活動能力指標 (オッズ比 : 1.24, $p < 0.001$)、睡眠時間 (オッズ比 : 1.72, $p < 0.01$) が統計学的に有意であった。食欲は、モデル 1 とモデル 2 において、また、口腔内症状の合計数はモデル 1 において有意な関連が認められた。この結果は、地域在住高齢者では、食欲と QOL が有意に関連していることを示している。さらに、口腔内症状の改善が QOL の向上には必要であると考えられた。

索引用語：食欲，生活の質，高齢者

口腔衛生会誌 54 : 241-248, 2004

(受付：平成 16 年 1 月 19 日 / 受理：平成 16 年 5 月 19 日)

緒 言

わが国では過去に例をみない速さで高齢化が進行している。65 歳以上の高齢者人口の割合は、2010 年には 22.0% にまで上昇すると予想されている¹⁾。折しも、2000 年 4 月から 21 世紀における国民健康づくり運動、いわゆる「健康日本 21」がスタートした。生涯を通じた健康づくりについての指針が示されており、健康寿命の延伸、すなわち生活の質の維持についても言及している。このような背景のもと、健康の評価方法として、従来の有病率や死亡率などの客観的な指標に加え、自己評価による健康度の測定が、本人自身の意思を反映するものとして徐々に採用されるようになってきた^{2,3)}。

歯科保健の分野においても、自己評価による健康度を評価指標に加えた調査が報告されてきている⁴⁻⁶⁾。その応用範囲は、日常の口腔状態を評価するものから歯科診療による症状改善の判定に応用するものまで幅広い。口腔

内の状況との関連においては、主観的健康観と咀嚼能力との関連⁷⁾や、食生活、残存歯数との関連を報告するものもある⁸⁾。これらを通じ、咀嚼能力の維持は、単に栄養補給のみでなく、生活の質 (QOL) にも影響を与えることが明らかになってきた。

ところで、高齢者を対象とした調査では、日常生活の楽しみごととして食事をあげる人が多い⁹⁾。高齢者にとって食事は、日常生活のなかで非常に大きな位置を占めており、QOL の向上に大きく寄与していることが考えられる。しかし、ほかの社会的要因や身体的能力などを踏まえたなかでの食事と QOL の関連については、いまだ整理が不十分である。特に、生理的欲求である食欲については、全身的な疾患の改善を評価する指標として採用された調査は報告されているが¹⁰⁻¹²⁾、いわゆるライフスタイルや口腔内の状態を加味した調査は報告されていない。本調査では、食欲と QOL との関連について、口腔内症状をはじめ身体的、社会的要因の影響を考慮に入れ

新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔保健推進学分野

* 国立保健医療科学院口腔保健部

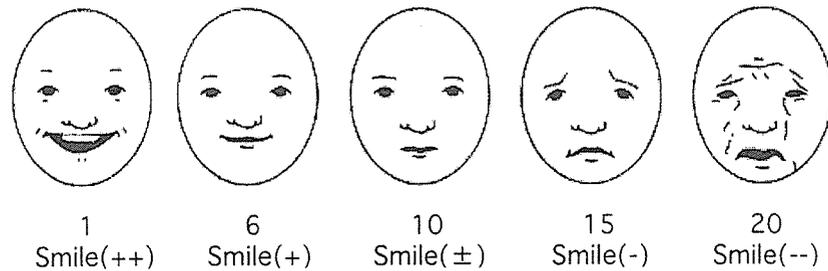


図1 フェイススケールのカテゴリー

フェイススケールはニコニコ状態の顔から涙顔まで20個の顔を並べ、自分の気分にあふさわしいものを選ぶ。今回の調査では、このうち5つの顔を使用した。なお図中の数値はフェイススケールのスコアを示す

ながら明らかにすることを目的としている。

対象および方法

1. 対象

1998年現在、新潟市在住の70歳、600人を対象とした。対象者の選定にあたっては、まず市内在住の70歳全員(4,542人)に葉書を送付し、調査への参加希望の可否を確認した。その後、参加希望者のなかから、母集団と男女の比率が同一になるように抽出し、本調査の対象者とした¹³⁾。

2. 方法

本調査ではQOLを総合的にあらわす指標として、Lorish & Maisiak¹⁴⁾の開発したフェイススケールを用い日常生活満足度を測定した。なお、本調査では、便宜的に5つのスコアを用いて測定を行った。すなわち、最近の生活満足状況について事前に用意した5つの顔の表情(図1)を対象者に示し、一番実感に近いものを選択してもらった。フェイススケールは、すでに Beck Depression Scale¹⁵⁾や The Sickness Impact Profile¹⁶⁾との相関が認められており¹⁴⁾、臨床分野では、治療の成果を主観的に評価する方法として採用され¹⁷⁻¹⁹⁾、有効性¹⁴⁾が示されている。

身体的要因として、口腔内症状、現在歯数、食欲、体力、処方薬の服用、社会的要因、およびブレスローが報告している7つの健康行動²⁰⁾を評価の対象とした。健康行動については、7つそれぞれの項目に加え、適切な状態に対し1点の点数を与え、その合計点数をもって、健康行動に対する総合的評価指標とした²⁰⁾。口腔内の症状については「歯の痛み」、「歯肉の痛み」、「歯の動揺」、「義歯による痛み」、「固いものを咀嚼する際の不自由感(咀嚼不自由)」のそれぞれの項目について、最近2~3カ月の症状の有無を質問紙により確認した。さらに、前述した

5項目の口腔内症状について、症状のある場合に1点を与え、最大5点の合計得点をもって、口腔内症状の総合的評価指標とした。処方薬の服用、家族や友人との交流、配偶者の有無、ブレスローの7つの指標、口腔内症状については聞き取りによる質問紙法を実施した。食欲に関しては、質問紙により「最近食欲があるか」という問いに対し、「ある」、または、「あるとはいえない」の2段階で評価した。体力指標については、握力、脚伸展力、脚伸展パワーを用いた。いずれも、相対的に比較する場合には、体格による影響が考えられる。そこで、体重で除することにより体格の影響を取り除くことが可能となる²¹⁾。本調査では、握力、脚伸展力、脚伸展パワーについて体重で除して評価した。脚伸展力については椅座位にて膝を90度に屈曲し、ロードセルに接続したベルトを足関節の位置にかけ、膝伸展時の最大等尺性張力を測定した。脚伸展パワーについては脚伸展パワー測定装置(Aneropress-3500, コンビ)を用いて測定した²¹⁾。さらに、状況対応や社会的役割の活動能力を総合的に評価する尺度として、老研式活動能力指標(0-13点)²²⁾を採用した。また、社会的要因として、家族や友人との交流および配偶者の有無を質問紙により確認した。

分析にあたっては、日常生活満足度(フェイススケール)とそれぞれの要因との関連を評価した。その後、各要因のなかで統計学的に5%以下で有意であったものを選択し多変量解析を行った。すなわち、日常生活満足度を従属変数にほかの要因を独立変数としてロジスティック回帰分析を行った。その際、回答者数の分布を考慮し、フェイススケールの Smile(++) で日常生活満足度を2群に分類する場合(モデル1)と Smile(+) で日常生活満足度を2群に分類する場合(モデル2)の2つのモデルで評価を行った。なお、すべての統計計算には、USA Stata Corporation 製の STATA 6 を用いた²³⁾。

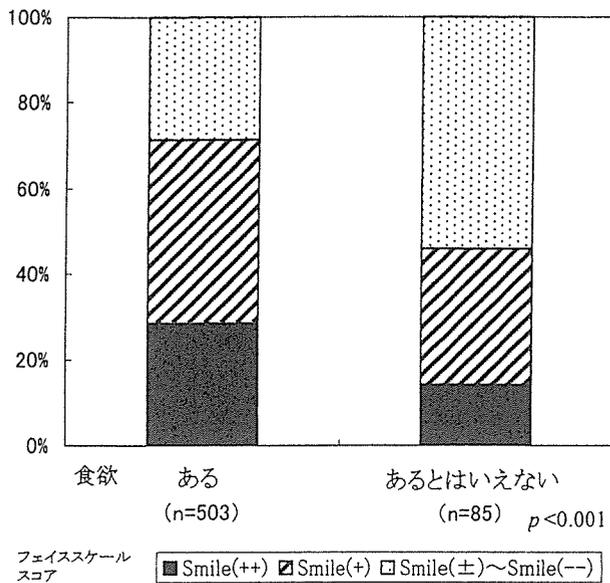


図2 食欲状況別フェイススケールスコアの比較

結 果

食欲とフェイススケールとの関連をみると、食欲があると回答している割合は Smile (++) (スコア: 1) で 92.3%, Smile (+) (スコア: 6) で 88.8%, Smile (±) ~ Smile (--) (スコア: 10~20) で 75.8% と、スコアが高くなるに従い有意に低くなった ($p < 0.001$, χ^2 検定)。また図2に示したように、Smile (±) ~ Smile (--) の割合は、食欲があると回答している人では 28.6% であったのに対し、食欲がないと回答している人では 54.1% に上昇した ($p < 0.001$, χ^2 検定)。

表1にフェイススケールと各種要因との関連を示す。フェイススケールと有意な関連の認められた項目は、口腔内症状では、歯の動揺 ($p < 0.05$, χ^2 検定)、義歯による痛み ($p < 0.05$, χ^2 検定)、咀嚼不自由 ($p < 0.01$, χ^2 検定) で、いずれも、フェイススケールのスコアの高いグループに「症状あり」と回答している人の割合が高かった。さらに、何らかの口腔内症状をもっている人は全体の 56.7% に達し、口腔内症状の合計得点でみると、Smile (++) で 0.9 ± 1.1 , Smile (+) で 1.2 ± 1.3 , Smile (±) ~ Smile (--) で 1.3 ± 1.3 であった ($p < 0.01$, 分散分析)。さらに、Scheffé の多重比較検定を行うと、口腔内症状の合計点では Smile (++) と Smile (±) ~ Smile (--) の間 ($p < 0.01$) で統計学的に有意であった。老研式活動能力指標との関連については、フェイススケールのスコアが高くなるに従い総得点が有意に減少する傾向が示され

た ($p < 0.01$, 分散分析)。さらに、Scheffé の多重比較検定を行うと、老研式活動能力指標の合計点では Smile (++) と Smile (±) ~ Smile (--) の間 ($p < 0.001$)、Smile (++) と Smile (±) ~ Smile (--) の間 ($p < 0.01$) で統計学的に有意であった。また、ブレスローの保健行動指標についてみると、睡眠時間が7~8時間以外である人のほうがフェイススケールのスコアが有意に高くなる傾向が示された ($p < 0.01$, χ^2 検定)。

次に、フェイススケールのスコアと統計学的に有意な関連の認められた要因または総合評価指標を独立変数に採用してロジスティック回帰分析を行った。表2に示したように、モデル1において、統計学的に有意であった独立変数は、食欲 (オッズ比: 2.77, $p < 0.05$)、口腔内症状の合計点 (オッズ比: 1.25, $p < 0.05$)、老研式活動能力指標 (オッズ比: 1.25, $p < 0.01$) であった。一方、モデル2において、統計学的に有意であった独立変数は、食欲 (オッズ比: 3.23, $p < 0.001$)、老研式活動能力指標 (オッズ比: 1.24, $p < 0.001$)、睡眠時間 (オッズ比: 1.72, $p < 0.01$) であった。

考 察

ロジスティック回帰分析により日常生活満足度 (本調査ではフェイススケールで評価) との関連をみると、食欲はいずれのモデルにおいても統計学的に有意であった。また、食欲の有無により日常生活満足度には大きな差が認められ、食欲がない人では、Smile (±) ~ Smile (--) に属する人の割合が5割を超えていた。高齢者にとって食欲は、日常生活満足度に大きくかかわっていることが考えられる。他方、Smile (±) ~ Smile (--) に属する人であっても、76%の人が食欲ありと回答していた。食欲は自己保存欲のひとつであり、通常、生命を維持するために必要十分な食事をとるようにコントロールされていることによると考えられる。しかし、多くの人が食欲ありと回答している一方で、何らかの口腔内症状をもっている人は多く、全体の 57% に達していた。特に、歯の動揺 (症状あり: 20.2%)、義歯による痛み (症状あり: 15.8%)、咀嚼不自由 (症状あり: 29.7%) についてはフェイススケールと有意な関連が認められた。また、ロジスティック回帰分析の結果によれば、口腔内症状の合計点はモデル1において日常生活満足度と有意であった。すなわち、食欲は大部分の人が維持できているが、比較的多くの人が歯の痛みや咀嚼不自由などの口腔内症状をもっており、日常生活で不自由を感じていることが考えられた。

本調査では、日常生活満足度との関連をロジスティッ

表1 分析対象者の属性・特性と生活満足度との関連

項目	カテゴリー	N	フェイススケール (Smile)				検定
			Smile (++)	Smile (+)	Smile (±) ~ Smile (--)	不明	
全体 (600人, 男性:306人, 女性:294人)			158 (26.8)	242 (41.0)	190 (32.2)	10 (-)	
歯の痛み	はい	128	34 (27.0)	51 (40.5)	41 (32.5)	2 (-)	NS
	いいえ	437	107 (24.8)	179 (41.5)	145 (33.6)	6 (-)	
	不明	35	17 (-)	12 (-)	4 (-)	2 (-)	
歯肉の痛み	はい	146	29 (20.0)	60 (41.4)	56 (38.6)	1 (-)	NS
	いいえ	419	112 (27.2)	170 (41.3)	130 (31.6)	7 (-)	
	不明	35	17 (-)	12 (-)	4 (-)	2 (-)	
歯の動揺	はい	114	19 (16.7)	46 (40.4)	49 (43.0)	0 (-)	p<0.05
	いいえ	451	122 (27.5)	184 (41.5)	137 (30.9)	8 (-)	
	不明	35	17 (-)	12 (-)	4 (-)	2 (-)	
義歯による痛み	はい	89	12 (14.1)	40 (47.1)	33 (38.8)	4 (-)	p<0.05
	いいえ	476	129 (27.3)	190 (40.3)	153 (32.4)	4 (-)	
	不明	35	17 (-)	12 (-)	4 (-)	2 (-)	
咀嚼不自由	はい	168	28 (17.0)	68 (41.2)	69 (41.8)	3 (-)	p<0.01
	いいえ	397	113 (28.8)	162 (41.3)	117 (29.8)	5 (-)	
	不明	35	17 (-)	12 (-)	4 (-)	2 (-)	
口腔内症状の合計得点 ^a	N: 平均値 (標準偏差)	600	141 0.9 (1.1)	230 1.2 (1.3)	186 1.3 (1.3)	43 -	p<0.01
現在歯数	0本	45	15 (34.1)	16 (36.4)	13 (29.5)	1 (-)	NS
	1~9本	96	19 (20.0)	40 (42.1)	36 (37.9)	1 (-)	
	10~19本	161	39 (24.5)	79 (49.7)	41 (25.8)	2 (-)	
	20本以上	297	85 (29.2)	106 (36.4)	100 (34.4)	6 (-)	
	不明	1	0 (-)	1 (-)	0 (-)	0 (-)	
握力/体重	N: 平均値 (標準偏差)	600	147 0.6 (0.1)	234 0.6 (0.1)	176 0.6 (0.1)	43 -	NS
開眼片足立ち	~19秒	150	39 (26.5)	69 (46.9)	39 (26.5)	3 (-)	NS
	20~39秒	105	24 (23.3)	38 (36.9)	41 (39.8)	2 (-)	
	40~119秒	157	35 (22.7)	68 (44.2)	51 (33.1)	3 (-)	
	120秒	157	50 (32.3)	57 (36.8)	48 (31.0)	2 (-)	
	不明	31	10 (-)	10 (-)	11 (-)	0 (-)	
脚伸展力/体重(両足)	N: 平均値 (標準偏差)	600	136 0.9 (0.3)	221 0.9 (0.3)	167 0.9 (0.3)	76 -	NS
脚伸展パワー/体重(MAX値)	N: 平均値 (標準偏差)	600	150 12.2 (4.1)	230 11.3 (4.0)	170 11.7 (4.4)	50 -	NS
老研式活動能力指標	N: 平均値 (標準偏差)	600	158 12.1 (1.3)	242 11.8 (1.5)	188 11.3 (1.8)	12 -	p<0.01
処方薬の服用	服用している	397	103 (26.4)	167 (42.8)	120 (30.8)	7 (-)	NS
	服用していない	192	52 (27.5)	72 (38.1)	65 (34.4)	3 (-)	
	不明	11	3 (-)	3 (-)	5 (-)	0 (-)	

体力

表1 つづき

社会的要因	家族や友人との交流	満足	546	143 (26.6)	223 (41.4)	172 (32.0)	8 (-)	NS
		満足しているとは いえない	50	13 (27.1)	17 (35.4)	18 (37.5)	2 (-)	
		不明	4	2 (-)	2 (-)	0 (-)	0 (-)	
配偶者	あり	424	112 (26.8)	179 (42.8)	127 (30.4)	6 (-)	NS	
	なし	171	45 (26.9)	61 (36.5)	61 (36.5)	4 (-)		
	不明	5	1 (-)	2 (-)	2 (-)	0 (-)		
朝食を規則正しく取る	はい (1)	576	152 (26.9)	231 (40.8)	183 (32.3)	10 (-)	NS	
	それ以外 (0)	18	5 (27.8)	8 (44.4)	5 (27.8)	0 (-)		
	不明	6	1 (-)	3 (-)	2 (-)	0 (-)		
間食を取る	いいえ (1)	97	32 (33.3)	40 (41.7)	24 (25.0)	1 (-)	NS	
	それ以外 (0)	497	125 (25.6)	199 (40.8)	164 (33.6)	9 (-)		
	不明	6	1 (-)	3 (-)	2 (-)	0 (-)		
定期的に運動	はい (1)	337	97 (29.3)	127 (38.4)	107 (32.3)	6 (-)	NS	
	それ以外 (0)	256	59 (23.4)	112 (44.4)	81 (32.1)	4 (-)		
	不明	7	2 (-)	3 (-)	2 (-)	0 (-)		
ブレスロー	睡眠	7~8時間 (1)	243	72 (30.0)	108 (45.0)	60 (25.0)	3 (-)	p<0.01
		それ以外 (0)	351	85 (24.7)	131 (38.1)	128 (37.2)	7 (-)	
		不明	6	1 (-)	3 (-)	2 (-)	0 (-)	
喫煙	いいえ (1)	102	23 (23.0)	42 (42.0)	35 (35.0)	2 (-)	NS	
	はい (0)	462	128 (28.1)	189 (41.5)	138 (30.3)	7 (-)		
	不明	36	7 (-)	11 (-)	17 (-)	1 (-)		
体重	変わらない (1)	393	101 (26.1)	165 (42.6)	121 (31.3)	6 (-)	NS	
	それ以外 (0)	160	47 (29.9)	61 (38.9)	49 (31.2)	3 (-)		
	不明	47	10 (-)	16 (-)	20 (-)	1 (-)		
酒類	ある程度・飲まない(1)	417	117 (28.5)	159 (38.8)	134 (32.7)	7 (-)	NS	
	毎日飲む (0)	145	34 (23.8)	71 (49.7)	38 (26.6)	2 (-)		
	不明	38	7 (-)	12 (-)	18 (-)	1 (-)		
ブレスローの合計得点 ^b	N: 平均値 (標準偏差)	600	148 3.9 (1.0)	224 3.7 (1.1)	168 3.7 (1.0)	60 -	NS	

^a: 口腔内の症状ありの合計数

^b: ブレスローの7つの健康行動で望ましいものの合計数

ク回帰分析で評価する際、フェイススケールの Smile (++) で日常生活満足度を2群に分類する場合 (モデル1) と、Smile (+) で日常生活満足度を2群に分類する場合 (モデル2) の2つのモデルで評価を行った。人数分布を考慮し、2つのカットポイントによる満足レベルでのモデルを設定した。その結果から、食欲と老研式活動能力指標は、モデル1および2のいずれにおいても統計学的に有意であった。一方、睡眠時間と口腔内症状の合計点はモデル1、またはモデル2のいずれかにおいて統計学的に有意であった。なお、睡眠時間は日常生活スタイル

を示す指標の1つである。しかし、本調査ではほかの日常生活スタイルに関する指標やブレスローの合計点と日常生活満足度との間には有意な関連が認められなかったことから、日常生活スタイルと日常生活満足度に一定の関連があるとはいいがたい。

モデル1と2のように従属変数に複数のカットポイントを設定して評価することは、従属変数と独立変数の関連の強さの程度を評価するうえで有効と考える。すなわち、食欲や老研式活動能力指標のようにいずれのモデルにおいても統計学的に有意であることは、いずれか一方

表2 ロジスティック回帰分析結果

独立変数	モデル1*			モデル2*		
	Odds Ratio	95%CI	p	Odds Ratio	95%CI	p
食欲 (0:ある, 1:あるとはいえない)	2.77	[4.55~1.16]	<0.05	3.23	[5.26~2.00]	<0.001
口腔内症状の合計点	1.25	[1.47~1.05]	<0.05	1.15	[1.33~1.00]	NS
老研式活動能力指標	1.25	[1.08~1.45]	<0.01	1.24	[1.11~1.39]	<0.001
睡眠 (0:7~8時間, 1:7~8時間以外)	1.23	[1.85~0.82]	NS	1.72	[2.56~1.18]	<0.01
性別 (1:男性, 2:女性)	1.28	[0.83~1.83]	NS	1.15	[0.29~1.66]	NS
Probability	<0.001			<0.001		
PseudoR ²	0.044			0.072		

*それぞれのモデルの従属変数 {モデル1:フェイススケールの Smile (++) と Smile (+, ±, -, --) で2分類
 {モデル2:フェイススケールの Smile (++, +) と Smile (±, -, --) で2分類

NS: not significant

のモデルにおいてのみ有意な関連が認められる場合と比較し、日常生活満足度とのより強い関連を意味している。特に食欲ではモデル2においてオッズ比が3.23であった。これは、食欲が「あるとはいえない」と回答している人は「ある」と回答している人と比較し、フェイススケールで Smile (±) ~ Smile (--) になる可能性が3.23倍であることを示している。食欲がないということはQOLの低下を招いていることを示唆している。なお、本調査では PseudoR² が低く、十分フェイススケールのスコアを説明できていないことを示している。調査結果の検討の際には、この点を加味して評価する必要があるだろう。

歯科界では、近年、口腔の健康と全身の健康との関連が強調されている。従来の関連調査をみると、林らは、脳卒中発症者の予後を評価するなかで、65歳以上では、食事の自立度とテレビをみる時間が日常生活満足度と有意な関連があったと報告している²⁴⁾。そのほか、健康度の自己評価と咀嚼能力との間に有意な関連も認められている²⁵⁾。高齢者にとって特に咀嚼力の維持は重要なテーマである。高齢者では義歯を装着している者が多いが、加齢とともに歯槽の変化がみられ、義歯の機能が衰えることも多い。食欲がありながら十分な食事ができないことのないように、すなわち高齢者が食事の喜びを維持できるようにするためにも口腔機能の保持・回復は不可欠であり、義歯を含めた口腔内症状の改善に努める必要がある。

以上、地域在住の高齢者では食欲とQOLに強い関連が認められ、さらにQOL向上のためには口腔内症状の改善が必要であることが明らかになった。

文 献

- 厚生労働省:厚生白書, 厚生労働省, 東京, 2000.
- 松林公蔵: 老年者の生活機能障害の総合評価, 地域在住老年者のADLとQOLに関する経年変化. 老年医学 36: 590-591, 1998.
- 中村好一, 金子 勇, 河村優子ほか: 在宅高齢者の主観的健康観と関連する因子. 日公衛生誌 49: 409-416, 2002.
- 神森秀樹, 葭原明弘, 安藤雄一ほか: 健康高齢者における咀嚼能力が栄養摂取に及ぼす影響. 口腔衛生会誌 53: 13-22, 2003.
- 長岡英一, 西 恭宏, 鎌下祐次ほか: Face Scaleによる下顎骨高度萎縮無歯顎患者の気分評価. 老年歯学 16: 356-365, 2002.
- 細井紀雄, 東條敏明, 鶴本明久ほか: 全部床義歯患者のQOLに関する調査と質問紙の作成. 老年歯学 16: 336-343, 2002.
- 三浦宏子, 荒井由美子: 地域高齢者における主観的健康度と咀嚼能力自己評価に関する調査研究. 老年歯学 12: 50-54, 1997.
- 吉田光由, 中本哲自, 佐藤裕二ほか: 歯の欠損が高齢者の生活の満足感に及ぼす影響について, 広島県呉市在住高齢者に対するアンケート調査より. 老年歯学 11: 174-180, 1997.
- 池田順子, 永田久紀, 工藤充子ほか: 80歳老人の食生活の実体. 日公衛生誌 38: 446-455, 1991.
- Lorenz KA, Shapiro MF, Assch SM et al.: Associations of symptoms and health-related quality of life: Findings from a national study of persons with HIV infection. Ann Int Med 134: 854-860, 2001.
- Velikova G, Wright P, Smith AB et al.: Self-reported quality of life of individual cancer patients: Concordance of results with disease course and medical records. J Clin Oncol 19: 2064-2073, 2001.
- Rees E, Hardy J, Ling J et al.: The use of the Edmonton Symptom Assessment Scale (ESAS) within a palliative care unit in the UK. Palliat Med 12: 75-82, 1998.
- 安藤雄一, 葭原明弘, 清田義和ほか: 高齢者を対象とした歯科疫学調査におけるサンプルの偏りに関する研究—質問紙の回答状況および健診受診の有無別にみた口腔および全身健康状態の比較—. 口腔衛生会誌 50: 322-333, 2000.

- 14) Lorish CD, Maisiak R : The face scale : A brief nonverbal method for assessing patient mood. *Arthritis Rheum* 29 : 906-909, 1986.
- 15) Beck AT, Ward CH, Mendelsohn M et al. : An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry* 4 : 561-571, 1961.
- 16) Bergner M, Rutta A, Bobbitt WE et al. : The sickness impact profile : Validation of a health status measure. *Med Care* 14 : 57-67, 1976.
- 17) Sloan JA, Loprinzi CL, Kuross SA et al. : Randomized comparison of four tools measuring overall quality of life in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 16 : 3662-3673, 1998.
- 18) Sheila JJ, Ernest AK, Prashant J et al. : Randomised trial of oral morphine for painful episodes of sickle-cell disease in children. *Lancet* 350 : 1358-1361, 1997.
- 19) 石原陽子, 一和多俊男, 倉光 薫ほか : QOL から見た非小細胞肺癌に対する化学療法の 4 週間欠投与法と少量分割投与法の無作為比較試験. *癌と化学療法* 25 : 1013-1020, 1998.
- 20) Breslow L, Enstrom JE : Persistence of health habits and their relationship to mortality. *Prev Med* 9 : 469-483, 1980.
- 21) 木村靖夫, 吉武 裕, 島田美恵子ほか : 80 歳高齢者の身体的自立に必要な体力水準について. *Research in Exercise Epidemiology* 2 : 23-31, 2000.
- 22) 古谷野 亘, 柴田 博, 中里克治ほか : 地域老人における活動能力の測定—老研式活動能力指標の開発. *日公衛誌* 34 : 109-114, 1987.
- 23) Stata Press : Stata statistical software : Release 6.0, Stata Corporation, College Station, Texas, 1997.
- 24) 林 博史, 阿彦忠之, 阿村誠司 : 山形県における脳卒中発症者の予後, ならびに生活全体の満足度とその関連要因. *日公衛誌* 42 : 19-30, 1995.
- 25) 寺岡加代, 柴田 博, 渡辺修一郎ほか : 高齢者の咀嚼能力と身体状況との関連について. *老年歯学* 11 : 169-173, 1997.

著者への連絡先 : 葭原明弘 〒951-8510 新潟県新潟市旭町通 1-757 新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔保健推進学分野

TEL : 025-227-2858

FAX : 025-227-0807

E-mail : akihiro@dent.niigata-u.ac.jp



An ingenious design for peptide vaccines

Akira Yano^{a,*}, Atsuko Onozuka^a, Yasuko Asahi-Ozaki^b, Susumu Imai^a,
Nobuhiro Hanada^a, Yoshikatsu Miwa^c, Tosiki Nisizawa^{a,c}

^a Department of Oral Health, National Institute of Public Health, Minami 2-3-6, Wako-shi, Saitama 351-0197, Japan

^b Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

^c Research and Development Center, Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc. Okayama, Japan

Available online 21 January 2005

Abstract

For humoral immunization, it may be possible to make effective and safe peptide vaccines for various diseases by selection of proper B-cell epitopes. However, a lack of T-cell epitopes on short peptides, such as those associated with major histocompatibility complex (MHC)-restriction, is a major problem for peptide vaccine development. We propose a solution for the design of peptide vaccines that involves induction of broadly reactive T-cell epitopes via agretopes. The strategy involves positioning multi-agretope type peptides on the N-terminal side of a di-lysine linker and B-cell epitopes on the C-terminal side. The addition of the arginine–glycine–aspartate (RGD)-motif to the N terminus of the peptide enhances its immunogenicity, and enables nasal immunization without adjuvants.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: RGD-motif; Multi-agretope; MHC-restriction

1. Introduction

The advantage of a peptide vaccine is that it can induce immune responses to a specific sequence of amino acids. However, the vaccine peptide must contain at least one major histocompatibility complex (MHC) binding motif (agretope) as an antigen, since antigens are presented by the immune system as a short peptide that binds to the MHC. Subsequently, the T-cell receptors recognize the peptide as a T-cell epitope on the MHC molecules [1–3]. For a humoral immune response, a peptide must have B-cell epitopes to induce specific antibodies and at least one agretope/T-cell epitope for presentation by MHC class II (MHC-II) molecules [1–3]. However, there are over 10 haplotypes of MHC-II in human [1] and the agretopes are different for each haplotype. The MHC-restriction is the most critical impediment to the development of peptide vaccines.

A peptide vaccine has another disadvantage. The weak antigenicity of peptide vaccines dictates a need for use of

strong adjuvants, such as Freund's, for induction of antibodies. Several approaches, such as liposome capsulation [4], MAPs [5], and lipopeptides [6] have been used to eliminate the need for strong adjuvants. We have introduced the arginine–glycine–aspartate (RGD)-motif into peptide antigens. The RGD-motif is the most representative cell attachment motif seems to enhance the binding of peptides to specific receptors. Antigenicity of the peptides was enhanced and nasal immunization by peptides was successful without adjuvants [7].

We have proposed a design for peptide vaccines that contain the RGD-motif, and the lysine linker (-KK-) that joins two peptides [7,8]. The lysine linker is the target sequence of the lysosomal protease, cathepsin B, which is one of the important proteases for antigen processing in the context of MHC-II antigen presentation [2]. When two peptide antigens are joined with -KK-, we can avoid induction of antibodies to the amino acid sequence that is generated by joining of two peptides and most antibodies are reactive to each peptide [8]. In our previous report, we have noticed a bias between the peptides, depending upon whether they are on the N- or C-terminal side of -KK- for induction of antibodies [7]. In this study, we have investigated the reason for this bias and pro-

* Corresponding author. Tel.: +81 48 458 6286; fax: +81 48 458 6288.
E-mail address: akiray@niph.go.jp (A. Yano).

pose the use of the bias as a solution to the MHC-restriction problem.

2. Materials and methods

2.1. Peptide synthesis

All peptides used in this study were synthesized by a step-wise solid-phase procedure as described previously [7]. Peptides were verified by MALDI-TOF/MS (Voyager-DETMMS TR work station: Applied Biosystems Foster City, CA) when necessary. The single-letter universally accepted notation for amino acids is used throughout the text.

2.2. Immunizations

BALB/c, B10.D2, B10.S, B10.A, and C3H/HeJ mice were obtained from Japan SLC Inc. (Shizuoka, Japan) and were used at 6 weeks of age to begin the immunization in all experiments. Groups of four to six mice were immunized intranasally with 50 µg of a peptide, either with or without 1 µg of cholera toxin (CT: Sigma-Aldrich, Missouri). A micropipettor was used to gently instill 4 µL of immunogen-containing saline solution into the nasal cavities of each mouse (2 µL into each nasal orifice). Two identical booster doses were given at 2-week intervals.

One group of mice was primed subcutaneously with 100 µg of peptides in 100 µL phosphate-buffered saline (PBS) either with or without 100 µL Freund's incomplete adjuvants (FIA: Pierce and Endogen: Funakoshi Co. Ltd., Tokyo, Japan). The same subcutaneous booster dose was given at 2-week intervals.

HA vaccine (split-product virus vaccine) was prepared from influenza virus A/PR/8/34 (A/PR8, H1N1) according to the method of Davenport et al. [9] at the Kitasato Institute (Saitama, Japan). Groups of BALB/c mice were intranasally immunized 1 µg of HA vaccine with 1 µg of peptide or 1 µg of CT. Four booster doses were given at 2-week intervals.

One week after the last booster dose, animals were bled and serum samples were prepared from clotted blood by centrifugation and stored individually with CompleteTM protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics Japan, Tokyo) and 0.05% (w/v) of sodium azide.

2.3. ELISA assays

Protein antigens used for ELISA were BSA, OVA, and PAc. Recombinant PAc was isolated from *Streptococcus mutans* TK18 as described previously [10]. For the ELISA, 96-well microtiter H-plates (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) were coated with 2 µg/well peptide or 1 µg/well protein antigen in 100 µL of 50 mM carbonate buffer pH 9.6 and held overnight at 4 °C. All assays were performed with alkaline phosphatase and *p*-nitrophenyl phosphate systems as described previously [7]. The OD_{405–620} was measured using

a microtiter plate reader (Multiskan BICHROMATIC, Labosystem, Helsinki, Finland). The ELISA antibody titer was expressed as the reciprocal of the highest dilution giving an OD_{405–620} of 0.1 unit above that of the control wells without antigen.

3. Results and discussion

3.1. Investigation of B-cell epitopes

SmU, with the amino acid sequence TYEAALKQ-YEADL, is a minimum peptide antigen (Pac365–377) for the induction of antibodies that cross react with the cell surface protein antigen of *S. mutans* [10]. SmU has both a strong B-cell epitope and the helper T-cell epitope for H-2^d haplotype mice, but lacks the T-cell epitope for H-2^s haplotype [11]. OVAp is a peptide antigen (OVA323–336: ISQAVHAA-HAEINE) for induction of antibodies that are cross-reactive to ovalbumin, which has strong epitopes for both B- and the T-cells of H-2^d haplotype mice [11]. To investigate the position bias of the peptide containing lysine linker, we synthesized the long peptides, SmU-KK-OVAp, OVAp-KK-SmU, RGD-SmU-KK-OVAp and RGD-OVAp-KK-SmU. We immunized mice both nasally and subcutaneously with the peptides, either with or without FIA. The serum titers to peptide antigens, PAc and OVA are shown in Fig. 1. In all cases, both SmU and OVAp were good antigens for BALB/c mice (H-2^d) and induced antibodies cross-reactive to PAc and OVA. When we focused on SmU, it was unclear whether the N- or C-terminal side of -KK- linker was the more favorable position for induction of antibodies to PAc. This was also true for OVAp. When the RGD-motif was added to the peptides

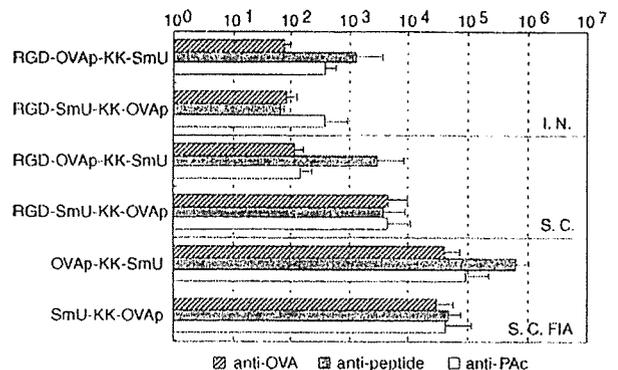


Fig. 1. Serum titres induced by intranasal and subcutaneous immunization with peptides. BALB/c mice were intranasally (I.N.) immunized with 50 µg of RGD added peptides, followed by two booster doses at two-week intervals. One hundred micrograms of peptide with FIA was used for subcutaneous (S.C.) immunization and immunization with RGD added peptides without adjuvant was followed by a booster dose given at a two-week interval. One week after the last booster dose, serum samples were collected and serum antibody titres were determined by ELISA. Average serum titers are shown for anti-OVA (hatched-box), anti-peptide antigen (grey-box) and anti-PAc (open box) with SD bars for each group.

and used for nasal immunization, SmU was a stronger antigen than OVAp, independent of its position. Those results clearly indicated that if both peptides, placed either on the N- or C-terminal side of -KK- linker, were strong enough as helper T-cell epitopes, antibody titers were dependent upon the strength of B-cell epitopes.

3.2. The position of T-cell epitopes and MHC-restriction

The effects of both the position and the strength of T-cell epitopes in the peptide, including the lysine linker, were examined. During the screening of SmU from the PAC, we had analyzed B- and T-cell epitopes of several peptides. PAC305–318 (NEADYQAKLTAYQT) has weaker B- and T-cell epitopes for H-2^d mice than SmU. However, unlike SmU, it has T-cell epitopes for H-2^s mice [11]. We have synthesized two peptides, SmU-KK-PAC305–318 and PAC305–318-KK-SmU that were used with FIA to subcutaneously immunize B10.D2 (H-2^d) and B10.S (H-2^s) mice (Fig. 2). B10.D2 mice responded with antibodies to both PAC305–318 and SmU in response to both peptides. SmU is a stronger B-cell epitope than PAC305–318, since anti-SmU titers are always higher than those of anti-PAC305–318. When we investigated the importance of the peptide position on either the N- or C-terminal side of the linker, the C-terminal position was best for induction of antibodies. B10.S mice produced antibodies only to the PAC305–318-KK-SmU. In this case, T-cell epitopes for H-2^s haplotype mice existed only on PAC305–318. Thus, we could conclude that T-cell epitopes should be placed on the N-terminal side of -KK- linker. The cause of this phenomenon is not clear. There may be molecular mechanisms that preferentially achieve MHC-II loading of peptides that are placed on the N-terminal side of the lysosomal digestion site. Since SmU lacks T-cell epitopes for H-2^s haplotype, B10.S mice could not produce antibodies by immunization with SmU alone. However, we were able to induce antibodies to SmU by immunization with PAC305–318-KK-SmU.

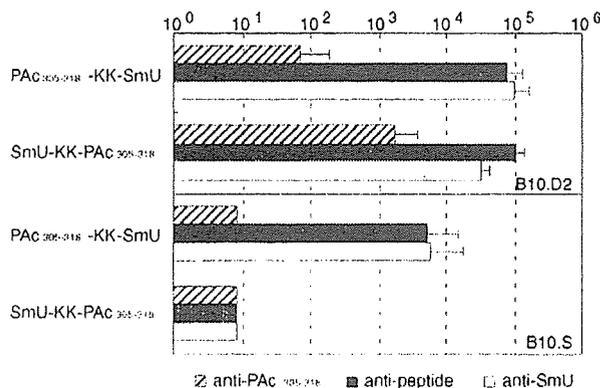


Fig. 2. Serum titres induced by subcutaneous immunization of peptides. B10.D2 and B10.S mice after subcutaneous immunization using peptides with FIA followed by a booster dose. Average serum titres are shown for anti-PAC305–318 (hatched-box), anti-peptide antigen (grey-box) and anti-SmU (open-box) with SD bars for each group.

This result shows a solution to MHC-restriction and points to the possibility of developing peptide vaccines for clinical use.

Thus, T-cell epitopes on the N-terminal side of -KK- linker were sufficient for induction of the antibodies. Therefore, if we placed the multi-agretope type peptide, broadly cross-reactive T-cell epitopes, such as T1 [12], Gag298–312 (KRWIILGLNKIVRMY)[13], or overlapping multi-agretope type peptide (OMP: LAVYWELLAKYLL-DRVQKVA) [7], on the N-terminal side of -KK- linker, we should be able to develop broadly effective peptide vaccines for human and veterinary use. However, peptides on the N-terminal side should not induce antibodies. We examined the ability of those peptides to induce antibodies by immunization of several types of mice. OMP and Gag298–312 with FIA were used to immunize B10.BR (H-2^k), B10.D2 (H-2^d), B10.S (H-2^s), BALB/c (H-2^d) and CH3/HeJ (H-2^k) mice and those peptides seemed to have very weak B-cell epitopes (Fig. 3A). Those peptides are suitable for T-cell epitopes in our peptide vaccines. We have synthesized peptides for induction of antibodies to SmU ((RGD-)OMP-KK-SmU) by immunization of B10.S mice (Fig. 3B). Intranasal immunization with OMP-KK-SmU alone did not induce specific antibodies because of its weak immunogenicity. Immunization with either RGD-added peptide alone or with CT induced

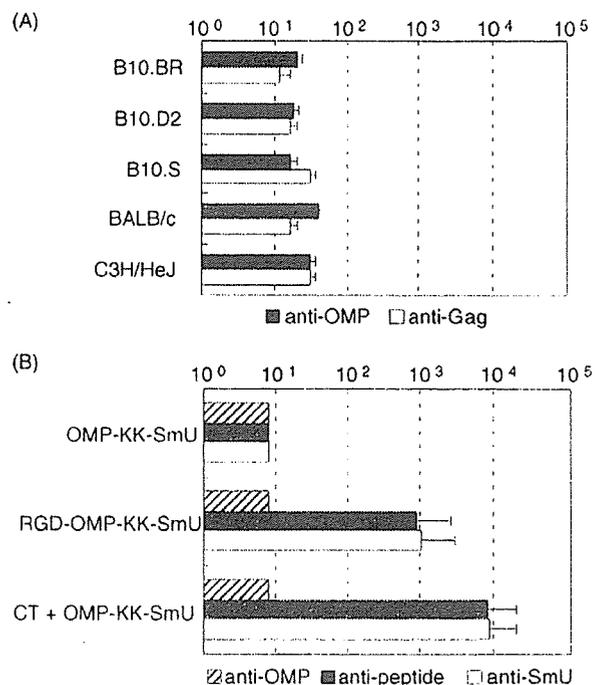


Fig. 3. Effect of multi-agretope type peptide on peptide antigens. (A) Each group of mice was immunized subcutaneously with FIA, followed by a booster dose, then specific antibody titres were determined by ELISA. Average titres are shown for anti-OMP (grey-box), and anti-Gag (open-box) with SD bars for each group. (B) B10.S mice were intranasally immunized either with or without CT. Average titres are shown for anti-OMP (hatched-box), anti-peptide antigen (grey-box), and anti-SmU (open-box) with SD bars for each group.

antibodies to SmU. OMP served as a T-cell for MHC-II of H-2^s mice in the same way as Pac305–318.

3.3. Application of the design of peptide vaccines

We have applied our design for peptide vaccines to an influenza vaccine. Several B-cell epitopes were reported that are involved in neutralization of the experimental strains of influenza virus A/PR8, HA1 (VTGLRNIPSIQSR) [14] and M2 (EVETPIRNEWGCRCNGSSD) [15]. We have synthesized peptide vaccines, RGD-Gag298-312-KK-HA1 and RGD-Gag298-312-KK-M2. In order to obtain high titer of antibodies, we immunized several mouse strains (data not shown) and B10.A was found to be the most reactive strain. Nasal immunization with peptides was repeated five times and serum titers were measured (Fig. 4A). In all cases, anti-HA1 and anti-M2 titers were specifically elevated. When two peptides were used for immunization at the same time, HA1 was a major antigen and when CT was used as mucosal adjuvant, M2 was major. It may be necessary to use additional approaches for the induction of antibodies to several peptides at the same time.

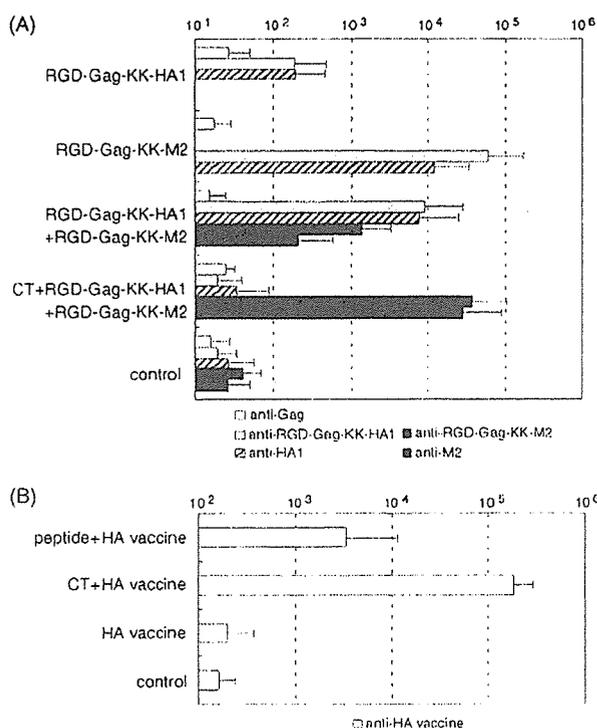


Fig. 4. Intranasal immunization with influenza vaccines. (A) B10.A mice were intranasally immunized with HA1 and M2 peptide vaccines, either with or without CT. Average titres are shown for anti-Gag (open-box), anti-HA1 (light grey-box), anti-RGD-Gag-KK-HA1 (hatched light grey-box), anti-M2 (dark grey-box) and anti-RGD-Gag-KK-M2 (hatched dark grey-box) with SD bars for each group. (B) BALB/c mice were intranasally immunized with influenza HA vaccine (1 μ g), with RGD-OMP-KK-OVAp (1 μ g), or CT (1 μ g), followed by four booster doses. Average anti-HA vaccine titres are shown as open-boxes with SD bars for each group.

Our peptide vaccines with the RGD-motif were reported as being useful adjuvants for nasal immunization [7]. When soluble proteins, such as BSA or OVA, were used for intranasal immunization with a small amount of RGD peptide vaccine, antibodies to BSA or OVA were strongly induced. However, background level antibodies to the RGD peptide were detected. In Fig. 4B, we have intranasally immunized mice using HA vaccines either with or without RGD peptide (RGD-OMP-KK-OVAp). The RGD peptide was already confirmed to be a nasal adjuvant in BALB/c mice [7]. After a series of five nasal immunizations, serum titers to HA vaccine were elevated by addition of the peptide, but the effects were weaker than when CT was added. In order to develop clinically useful peptide vaccines and adjuvants, we have to select for strong B-cell epitopes and develop the methods for enhancing the adjuvanticity of peptides.

In conclusion, our approach to the design of a peptide vaccine enables intranasal immunization without the need for adjuvant and solves the problem of MHC-restriction. Specifically, the design places the RGD at the N-terminus, a multi-agreotope peptide at the N-terminal side of lysine linker, and a B-cell epitope at the C-terminus. We suggest that our design might be universally applicable to the development of peptide vaccines and adjuvants for intranasal vaccination.

Acknowledgments

We would like to thank Ms Makiko Teramura-Hiramatsu, Ms Miho Sawada and Ms Yukiko Yamamoto for their assistance in performing the study. This work was supported by grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

References

- [1] Margulies DH. The major histocompatibility complex. In: Paul WE, editor. *Fundamental immunology*. 4th ed. New York: Lippincott-Raven; 1999. p. 263–85.
- [2] Lennon-Duménil AM, Bakker AH, Wolf-Bryant P, Ploegh HL, Lagaudrière-Gesbert C. A closer look at proteolysis and MHC-class-II-restricted antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 2002;14(1):15–21.
- [3] Bjorkman PJ. MHC restriction in three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions. *Cell* 1997;89(2):167–70.
- [4] Alving CR, Koulchin V, Glenn GM, Rao M. Liposomes as carriers of peptide antigens: induction of antibodies and cytotoxic T lymphocytes to conjugated and unconjugated peptides. *Immunol Rev* 1995;145:5–31.
- [5] Tam JP. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85(15):5409–13.
- [6] BenMohamed L, Wechsler SL, Nesburn AB. Lipopeptide vaccines—yesterday, today, and tomorrow. *Lancet Infect Dis* 2002;2(7):425–31.
- [7] Yano A, Onozuka A, Matin K, Imai S, Hanada N, Nisizawa T. RGD motif enhances immunogenicity and adjuvanticity of peptide antigens following intranasal immunization. *Vaccine* 2003;22(2):237–43.

- [8] Oishi Y, Onozuka A, Kato H, Shimura N, Imai S, Nisizawa T. The effect of amino acid spacers on the antigenicity of dimeric peptide-inducing cross-reacting antibodies to a cell surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16(1):40–4.
- [9] Davenport FM, Hennessy AV, Brandon FM, Webster RG, Barrett CD, Lease GO. Comparisons of serologic and febrile responses in humans to vaccination with influenza A viruses or their hemagglutinins. *J Lab Clin Med* 1964;63:5–13.
- [10] Senpuku H, Miyauchi T, Hanada N, Nisizawa T. An antigenic peptide inducing the cross-inhibiting antibodies against the interaction of *Streptococcus mutans* PAc with human salivary components. *Infect Immun* 1995;63(12):4695–703.
- [11] Senpuku H, Iizima T, Yamaguchi Y, Nagata S, Ueno Y, Saito M, et al. Immunogenicity of peptides coupled with multiple T-cell epitopes of a surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Immunology* 1996;88(2):275–83.
- [12] Ahlers JD, Takeshita T, Pendleton CD, Berzofsky JA. Enhanced immunogenicity of HIV-1 vaccine construct by modification of the native peptide sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(20):10856–61.
- [13] Wilson CC, Palmer B, Southwood S, Sidney J, Higashimoto Y, Appella E, et al. Identification and antigenicity of broadly cross-reactive and conserved human immunodeficiency virus type 1-derived helper T-lymphocyte epitopes. *J Virol* 2001;75(9):4195–207.
- [14] Rajnavölgyi É, Horváth A, Gogolák P, Tóth GK, Fazekas G, Fridkin M, et al. Characterizing immunodominant and protective influenza hemagglutinin epitopes by functional activity and relative binding to major histocompatibility complex class II sites. *Eur J Immunol* 1997;27(12):3105–14.
- [15] Neirynck S, Deroo T, Saelens X, Vanlandschoot P, Jou WM, Fiers W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med* 1999;5(10):1157–63.

Oral Streptococci Exhibit Diverse Susceptibility to Human β -Defensin-2: Antimicrobial Effects of hBD-2 on Oral Streptococci

Eisaku Nishimura,^{1,2} Akiko Eto,¹ Masatoshi Kato,² Shuichi Hashizume,² Susumu Imai,¹ Tosiki Nisizawa,¹ Nobuhiro Hanada¹

¹Department of Oral Health, National Institute of Public Health, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

²Research Institute, Morinaga & Co., Ltd., 2-1-1 Shimosueyoshi, Tsurumi-ku, Yokohama 230-8504, Japan

Received: 11 March 2003 / Accepted: 7 May 2003

Abstract. We examined the antimicrobial effects of human β -defensin-2 (hBD-2) on 17 species of oral streptococci to investigate the involvement of antimicrobial peptide activity in oral microflora development and the clinical use of the antimicrobial peptide for oral microflora control. Oral streptococci exhibit diverse levels of susceptibility to human β -defensin-2 (hBD-2). Two major cariogenic bacterial species, *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) and *S. sobrinus*, were found to be susceptible to the peptide, indicating that it is a potential therapeutic agent for preventing dental caries. *S. mitis* exhibited the lowest susceptibility to the peptide. *S. mitis* is a major indigenous bacterium in the oral microflora, and our results suggest that it might possess a certain resistance mechanism against hBD-2.

In the oral cavity, antimicrobial peptides such as defensin, histatin, and cathelicidin play a pivotal role as a first-line defense against a succession of invading bacteria [14]. β -defensins are small, cationic, antimicrobial peptides, and hBD-1, -2, -3 were detected in the salivary gland, gingiva, tongue, and buccal mucosa [4, 5, 11]. β -defensins exert their bactericidal activity by acting on the bacterial membrane, and epithelial cells of the oral mucosal barrier upregulate hBD-2 and hBD-3 upon stimulation by bacterial components or inflammatory mediators [5, 11].

More than 500 different kinds of resident bacteria form a normal flora in the oral region exposed to the action of the host defense system [6]. Therefore, we assumed that commensal bacteria may possess certain mechanisms of escaping the host immune system. Furthermore, oral microflora found in each oral region vary in composition, and antimicrobial peptides could be one of the determinants of development of normal oral flora through their activities. We were also interested in the oral application of antimicrobial peptides for clinical uses, particularly for prevention of dental caries [12]. Dental caries are ideal as a model for the clinical use of antimicrobial peptides, in which the

peptides are easily and directly delivered to the diseased part.

In this study, we examined the antimicrobial effects of hBD-2 on several *Streptococcus* species. This genus includes two cariogenic species, *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) and *S. sobrinus*, and their total population comprises the largest percentage of the total population in the oral region [6].

Materials and Methods

Reagents. A synthetic hBD-2 peptide was purchased from the Peptide Institute (Osaka, Japan). The activity of the peptide was confirmed previously [7] and was examined by using an *E. coli* strain IFO15044 as the control in this study. The medium used for the bacterial culture was from Difco (Michigan, USA). Low-melt, low-electro-osmosis ultrapure agarose (Gibco BRL, USA) was used after confirming its suitability for antimicrobial assay. Other reagents used were purchased from Wako or Sigma, unless otherwise specified.

Bacterial strains and antimicrobial assay. The bacterial strains were obtained from American Type Culture Collection (ATCC), Gifu Type Culture Collection (GTC), or Institute for Fermentation OSAKA Collection (IFO) and are listed in Table 1. To determine the antimicrobial activity of hBD-2 against various streptococcal strains, we employed the radial diffusion assay because this method has been described to be sensitive and to yield reproducible results [3, 9, 13]. Briefly, bacterial cells precultured overnight were grown to log phase in trypticase soy broth at 37°C. They were harvested by

Table 1. Susceptibilities of oral streptococcal strains and *E. coli* to hBD-2

MBC ^a (μg/mL)	Strain	
<10	<i>E. coli</i>	IFO 15044
	<i>S. salivarius</i>	ATCC9757
	<i>S. gordonii</i>	ATCC10558 ^T
	<i>S. sanguinis</i>	ATCC10556 ^T
	<i>S. mutans</i>	ATCC25175 ^T
	<i>S. sobrinus</i>	ATCC33478 ^T
	<i>S. macacae</i>	ATCC35911 ^T
	<i>S. ferus</i>	ATCC33477 ^T
	<i>S. criceti</i>	ATCC19642 ^T
	<i>S. rattii</i>	ATCC19645 ^T
	<i>S. pyogenes</i>	GTC262 ^T
	<i>S. constellatus</i>	ATCC27823 ^T
	<i>S. intermedius</i>	ATCC27335 ^T
	<i>S. oralis</i>	GTC276 ^T
	<i>S. downei</i>	ATCC33748 ^T
	<i>S. agaractiae</i>	GTC1234 ^T
10<, <100	<i>S. anginosus</i>	ATCC33397 ^T
100<	<i>S. mitis</i>	GTC495 ^T

^a MBC, minimal bactericidal concentration.

centrifugation, washed, quickly resuspended in 1% low-melt agarose/10 mM sodium phosphate buffer, and spread onto a culture dish placed on a level platform to obtain a uniform layer. After the bacterial layer was solidified, wells 3 mm in diameter were formed in the layer. The concentration of the peptide in the wells was 0, 1.6, 3.2, 6.3, 12.5, 25, 50, 100, or 200 μg/mL. The resulting diameter of

the clear zone surrounding the wells was measured, expressed in units (0.1 mm = 1 U) and plotted against the logarithm of the hBD-2 concentration [9].

Results

The 17 oral streptococcal strains used in this study are listed in Table 1. *Streptococcus* species were classified into six groups based on serological typing, DNA relatedness including finger-printing, and 16S rRNA sequences: the pyogenic, anginosus, mitis, salivarius, bovis, and mutans groups [8, 10]. We selected representative species for each group, which are frequently found in the oral cavity, except for the bovis group.

The antimicrobial activity of hBD-2 against oral streptococci was determined by the radial diffusion assay with a peptide concentration of 0–200 μg/mL. With the range of peptide concentrations assayed, hBD-2 was found to exert a dose-dependent antimicrobial activity against all strains of oral streptococci (Fig. 1). However, their susceptibilities to the peptide varied. To compare their susceptibilities, we adopted the theoretical minimal bactericidal concentration (MBC) described by Qu et al. [13], which corresponds to the x intercept of the plots, indicating minimal peptide concentration required to form a clear zone [13] (Table 1). The most susceptible species tested was *S. gordonii*; an hBD-2 concentration

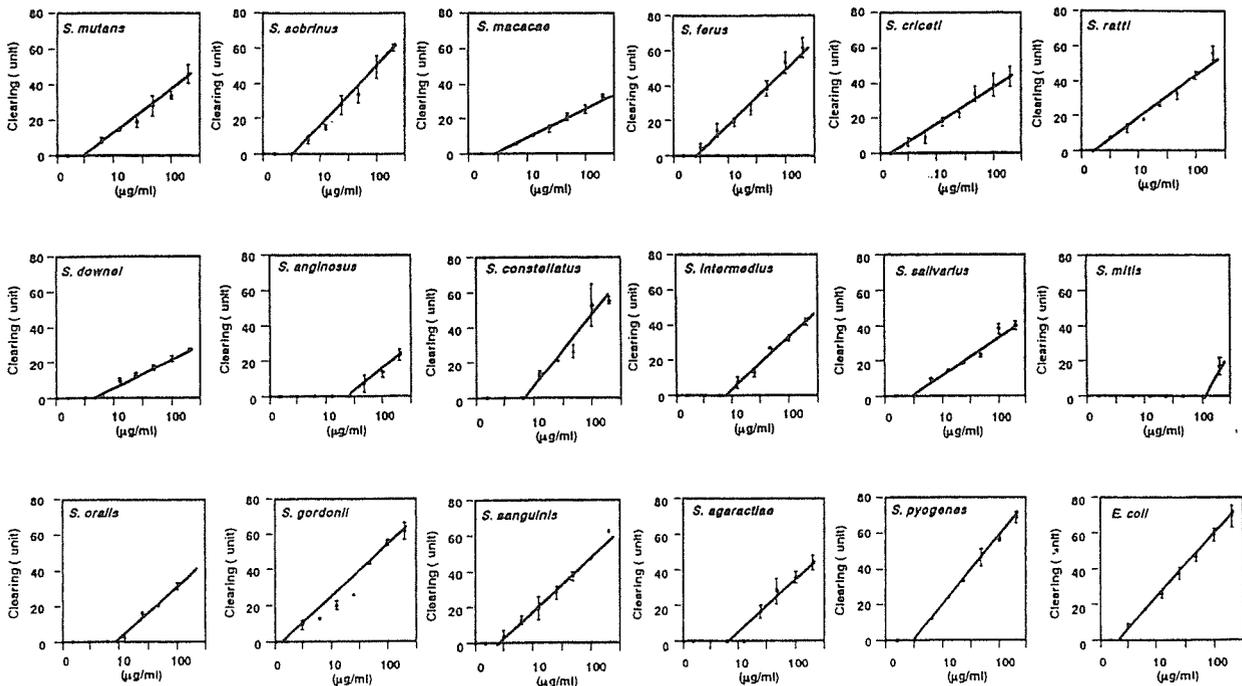


Fig. 1. Dose-dependent effects of hBD-2 on several species of oral streptococci. The antimicrobial activity of hBD-2 was determined by the radial diffusion assay as described in Materials and Methods. Each result is the mean of three experiments, and error bars indicate the standard deviation.

of 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was sufficient to kill this bacterium. On the other hand, two species, *S. anginosus* and *S. mitis*, exhibited low susceptibility to the peptide. In particular, an hBD-2 concentration higher than 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was necessary to exert its bactericidal activity against *S. mitis*. The low susceptibility of this species to hBD-2 is common to two strains, *S. mitis* GTC495T and *S. mitis* ATCC6249, suggesting that this is a characteristic unique to the species (data not shown). As to its effects against pathogenic bacteria, hBD-2 effectively exerted its antibacterial activity against cariogenic bacteria, *S. mutans* and *S. sobrinus*, and against inflammatory bacteria, *S. agalactiae* and *S. pyogenes*.

Discussion

Our results showed that species of the genus *Streptococcus* exhibited diverse susceptibility to hBD-2. There was no correlation between the group of strains and susceptibility. Although in vivo-mimic conditioned experiments that take into consideration the nature of a biofilm might be necessary, examination of the susceptibility of panels of bacterial species to antimicrobial peptides is the first step toward its clinical application [2, 12]. The bactericidal activity of hBD-2 against *S. mutans* and *S. sobrinus* suggests its potential for clinical use, namely, in the prevention of dental caries.

Our results also revealed that *S. mitis* and *S. anginosus* had significantly low susceptibility to hBD-2, indicating that these bacteria may possess a certain resistance mechanism against the bactericidal action of hBD-2. This peptide is considered to act on bacterial membranes in a nonspecific electrostatic manner; a certain molecule that interacts with hBD-2 before it enters the bacterial membrane could be involved in the resistance mechanism. *S. mitis* is one of the major bacteria in the oral indigenous microflora, and it appears at the earliest stage after birth in the human oral cavity [6]. Although the relationship between the host immune system and healthy normal flora has not been extensively studied [1], it is rational to consider that indigenous bacteria may possess a mechanism to overcome the host defense system, leading to their coevolution.

Acknowledgments

We thank Ms. R. Jitsukawa and Ms. M. Ochiai for technical support, and members of our laboratory for helpful discussion. This work was supported by research grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

Literature Cited

1. Boman HG (2000) Innate immunity and the normal microflora. *Immunol Rev* 173:5–16
2. Cate JM, Marsh PD (1994) Procedures for establishing efficacy of antimicrobial agents for chemotherapeutic caries prevention. *J Dent Res*, 73:695–703
3. Cole AM, Ganz T (2000) Human antimicrobial peptides: analysis and application. *Bio-Techniques* 29:822–831
4. Diamond DL, Kimball JR, Krisanaprakomkit S, Ganz T, Dale BA, (2001) Detection of β -defensin secreted by human oral epithelial cells. *J Immunol Methods* 256:65–76
5. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM (2001) Isolation and characterization of human β -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276:5707–5713
6. Hardie JM, Marsh PD (1978) Streptococci and the human oral flora. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 7:157–206
7. Hiratsuka T, Nakazato M, Date Y, Ashitani J, Minematsu T, Chino N, Matsukura S (1998) Identification of human β -defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia. *Biochem Biophys Res Commun* 249:943–947
8. Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Miura H, Ezaki T (1995) Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bacteriol* 45:406–408
9. Lehrer RI, Rosenman M, Harwig SS, Jackson R, Eisenhauer P (1991) Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J Immunol Methods* 137:167–173
10. Marsh P, Martin MV (1999) Oral microbiology, 4th edn. Oxford, Auckland, Boston, Johannesburg, Melbourne, New Delhi: Wright
11. Mathews M, Jia HP, Guttmiller JM, Losh G, Graham S, Johnson GK, Tack BF, McCray PB, Jr (1999) Production of β -defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary gland. *Infect Immun* 67:2740–2745
12. Miyazaki KT, Lehrer RI (1998) β -sheet antibiotic peptides as potential dental therapeutics. *Int J Antimicrob Agents* 9:269–280
13. Qu XD, Harwig SSL, Oren A, Shafer W, Lehrer RI (1996) Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to protegrins. *Infect Immun* 64:1240–1245
14. Weinberg A, Krisanaprakornkit S, Dale BA (1998) Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. *Crit Rev Oral Biol Med* 9:399–414

Dental Caries and Carbohydrates

虫歯と糖

今井 奨

Susumu Imai

国立保健医療科学院口腔保健部
埼玉県和光市南2-3-6Department of Oral Health, National Institute of Public Health
2-3-6, Minami, Wako-shi, Saitama 351-0197, Japan

Summary

Dental caries is defined as destructive phenomenon of tooth induced by direct action of oral bacteria and its metabolic products. A large number of observational studies have shown that there is close correlation between the level of sugar consumption and the prevalence and severity of dental caries. Diet may exert an effect on dental caries by reacting with enamel surface and by serving as a substrate for cariogenic bacteria. In this article, the relationship between dental caries and dietary sucrose is described according to the evidence concerning epidemiological studies and experimental medical studies including animal and human experiments. Interrelationship examined by systematic review between sucrose consumption and dental caries experience especially in modern age of fluoride exposure is also described. Cariogenicity of sucrose is usually explained by its two major

characteristics. Sucrose acts as substrate for sticky water-insoluble glucan production by glucosyltransferase of mutans streptococci, and as substrate for organic acid production by mutans streptococci and other oral bacteria. The prevention of dental caries by xylitol is extensively investigated using chewing gum, and the possibility in the prevention of dental caries induction is demonstrated. Recently, two functional carbohydrates, funoran and phosphoryl-oligosaccharide are developed in Japan. The chewing gums containing these functional carbohydrates are approved as "Hoods for specified health use" by the Ministry of Labour, Health and Welfare. These chewing gums promote remineralization of enamel. The caries preventive effect of these functional hoods should be examined in future research.

1. はじめに

虫歯（う蝕）は“微生物およびその分泌物の直接の作用によって生ずる歯質（硬組織）の崩壊現象”¹⁾と定義されるように、口腔内に棲息する微生物と深い関わりをもつ疾病であると同時に、口腔内微生物のエネルギー代謝、特に糖質代謝と深い関わりをもつ疾病といえる。糖質の中でも虫歯に関する因子として特にスクロースがよく知られている。科学的な証拠はなかったが rampant cariesの患者の食事にはしばしばスクロース含有食品が

含まれていたという特定のパターンが浮上ってきて、スクロースがう蝕の原因の“the arch criminal”つまり主要な犯人と表現されるようになってきた²⁾。本章では虫歯と糖、特にスクロースがどのような関係にあるのかを科学的な証拠を元に考えてみたい。

2. う蝕発症とスクロース

2-1. 疫学的証拠

う蝕は宿主因子、細菌因子、食餌因子が重複し、それ

がある程度長時間共存したときに発症するといわれている³⁾が、食餌因子の中でも特にスクロースがう蝕発症に深く関わることを検証するのに疫学研究は大いに役立った。図1は第二次世界大戦時にスクロース消費量が激減するのに比例して子供のう蝕罹患率が減少し、戦後スクロース消費が上昇するにつれう蝕罹患率も上昇して

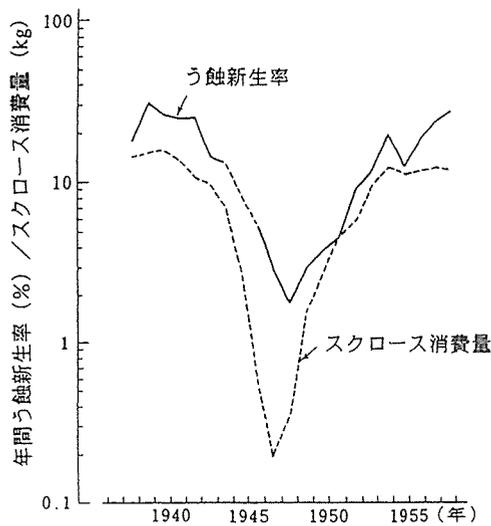


図1. 7~8歳の男児における年度別第一大臼歯年間う蝕新生率と年間スクロース消費量 (文献4より引用)

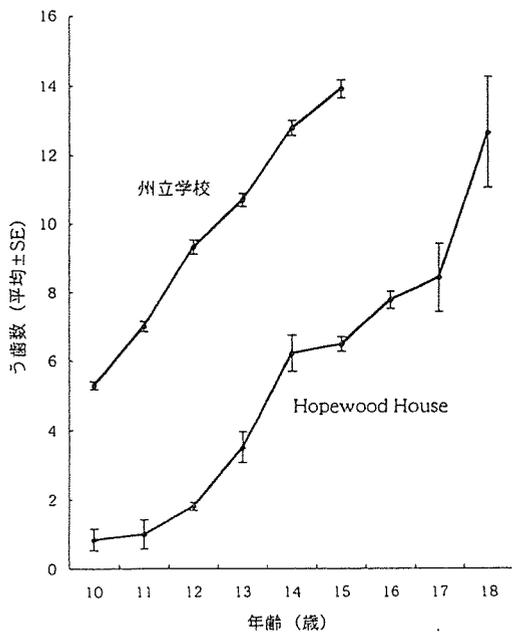


図2. Hopewood Houseと州立学校の子供のう蝕数の比較 (文献5より改変)

いる⁴⁾。このことがう蝕発症にスクロースが直接的に関与していることを必ずしも示すものではないが、う蝕発症がスクロース摂取量という環境要因によって影響を受けることを間接的に示唆するものである。

う蝕発症とスクロースの関係をより明確に示した疫学調査にオーストラリアの孤児院 Hopewood Houseでの調査⁵⁾がある。図2にみられるように、生後間もなくこの施設に預けられ、スクロースと精製した糖質を与えられずに育てられた孤児達のう蝕数は、州立学校に通う同年代の子供達のう蝕数よりも明らかに少なかった。10歳時では州立学校の生徒のう蝕数が5.28本に対して、施設の子供達のう蝕数は0.85本であった。15歳時でも州立学校での13.91本に対して施設では6.46本と約50%のう蝕数であった。もちろん施設の子供達に糖質が与えられなかったわけではなく、ジャガイモ、小麦、大豆等から必要な糖質は十分に確保されていた。その後、施設を出てスクロースを含んだ普通の食事になっていくと一般家庭の子供達と同様にう蝕数は急激に増加していく。この観察からスクロースの摂取がう蝕の発生に深く関わることを示されている。

これとほぼ同時期にスウェーデンのVipeholm 精神病院で行われた5年にわたる疫学研究は、DMF歯数でみたう蝕の増加がスクロース摂取およびその摂取の仕方と深く関わることを如実に示した (図3)⁶⁾。標準食のみの対照群のほか、トフィー、チョコレート、キャラメル、パン、スクロースなどを追加摂取する群に分け、また、食事時にのみ摂取する時期と自由に摂取する時期を決めて各群のう蝕数の推移を調べた。その結果、標準食のみではう蝕の発生はごくわずかであったが、食間にスクロース含有のトフィー、チョコレート、キャラメルを摂取す

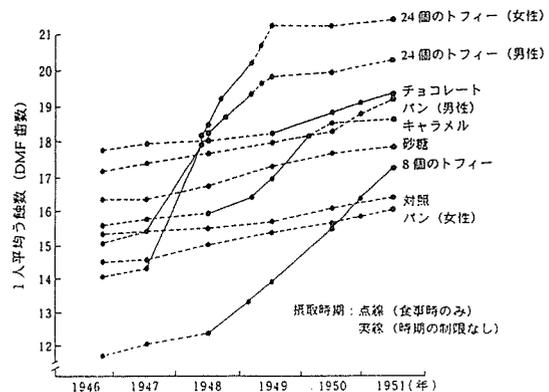


図3. スクロースの摂り方とう蝕の発生 [Vipeholm研究] (文献6より改変)

るとう蝕は急激に増加した。特にトフィーとキャラメルでの増加が顕著であった。同じおやつを食事時に定期的に摂取した群のう蝕の増加は緩やかなものであった。スクロースを食事時に摂取してもやはりう蝕の増加は緩やかであった。これらの結果から、う蝕発生はスクロースの摂取量そのものよりもスクロースを含有する食品の形態とその摂取時期に大きく影響されることが示された。

また、フィンランドのTurku市で、被験者の摂取する食品中の甘味料をすべてスクロース、フルクトース、またはキシリトールに置換して2年間にわたる調査が追跡する大掛かりな調査が行われた⁷⁾ (図4)。スクロース摂取群とフルクトース摂取群では1年後にう蝕菌面数は同程度に増加したが、2年後にはスクロース群でさらに増加、フルクトース群で横ばいとなった。一方、キシリトール群では2年後でもう蝕菌面数の増加はほとんどみられなかった。この結果は、スクロースがう蝕の発生に密接に関与していること、スクロースを非発酵性のキシリトールに置換するとう蝕はほとんど発生しないことを端的に示していると同時に、う蝕予防における代用甘味料の有効性を示唆しており、代用甘味料開発の先駆けになったともいえる。

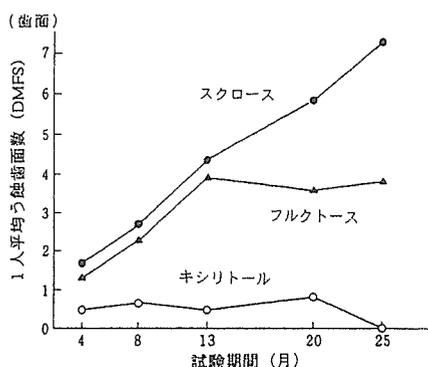


図4. 各糖質のう蝕誘発能の2年間にわたる調査 [Turku Sugar研究] (文献7より改変)

2-2. 実験医学的証拠

疾病メカニズムを実験医学的に解明するには動物を用いた研究が有用かつ必要不可欠であり、う蝕においても例外ではない。特定の病原性微生物を持たないSPF (Specific pathogen-free) ラットにう蝕誘発性高スクロース食を与えてもう蝕は発生しないことが確かめられているが、SPFラットやハムスターにミュータンスレンサ球菌を感染させ、適当なう蝕誘発食を与えるとう蝕が発生することが知られている⁸⁾。う蝕誘発食で最も多く使われているのはKeyesらの開発した粉末飼料#2000⁹⁾である。この飼料はスクロースを56%含む高スクロース飼料である。

表1は主な口腔細菌によるスクロースの利用と実験う蝕誘発能を示している⁹⁾。口腔内の各種レンサ球菌、乳酸桿菌、真菌のCandidaなどはいずれもスクロースを利用(代謝)して酸を産生するが、これらの微生物のうち動物で明確な実験う蝕を誘発できるのは2種のミュータンスレンサ球菌 (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*) のみである。

Shaw¹⁰⁾は糖質のう蝕誘発性に関する動物実験についての総説の中で、糖質のう蝕誘発能は動物種、年齢、う蝕の部位、口腔フローラ、食餌中の糖質のタイプなど種々の要因によって影響を受けるが、制御された口腔フローラの条件下では、ラットやハムスターにおいてスクロースのう蝕誘発性が他の糖質のう蝕誘発性よりも高いという報告が多いことを示している。また、Ooshimaら¹¹⁾はSPFラットを用いた実験で、*S. sobrinus*を感染させて、スクロース56%を含むう蝕誘発性飼料で55日間飼育すると明瞭なう蝕が観察されること、この飼料のスクロース部分を小麦粉に置換した対照の飼料ではスクロースの場合の7~8分の1以下の低う蝕スコアしか観察されないこと、スクロースを28%、17%と減らすと濃度依存的にう蝕スコアも減少すること、56%含まれるスクロ-

表1. 主な口腔細菌によるスクロースの利用と実験う蝕誘発能

微生物	スクロースの利用			う蝕誘発	
	酸産生	グルカン生成	菌の付着	裂溝部	平滑面
<i>S. mutans</i>	++	+++	+++	+++	++
<i>S. sobrinus</i>	++	+++	+++	+++	+++
<i>S. sanguis</i>	++	+++	±	±	-
<i>S. mitis</i>	++	-	±	±	-
<i>S. salivarius</i>	++	+++	-	±	-
乳酸桿菌	++	-	-	±	-
<i>Candida</i>	++	-	-	-	-

文献8より引用

スの一部あるいは半分をスクロースの構造異性体であるパラチノースまたはトレハロースで置き換えると、スクロースを56%含む飼料を与えた場合よりも明瞭にう蝕の発生が低下し、しかも小麦粉で置き換えた場合よりもう蝕スコアは減少することを示した。このようにミュータンスレンサ球菌感染ラットにおけるう蝕発生は飼料中のスクロースに強く関連していることがわかる。

上記の動物実験以外にもヒトによる *in vivo* 実験もある。被験者固有のアプライアンスを作製し、それにウシ・エナメル歯片を固定してヒトの口腔内に数日間装着し、糖質のう蝕誘発性を調べた報告がある¹²⁾。エナメル歯片をスクロースで処理すると明らかなエナメル質の脱灰が起こるが、イソマルトースでは脱灰が有意に低いことが示された。この場合の細菌源は被験者の口腔内フローラである。この方法の原法はKoulouridesら¹³⁾によってエナメル質の脱灰と再石灰化研究のために考案されたものである。被験者におけるエナメル質の脱灰度を歯片の硬度変化で評価する方法はICT (Intraoral cariogenicity test) と呼ばれており、糖質のう蝕誘発性の評価にも用いられる。彼らは被験者のアプライアンスにウシ・エナメル歯片を固定して1週間口腔内に装着し、実験前後のエナメル質硬度を測定した。歯片へのスクロース処理は口腔外で1日4回、10分間ずつ行った。対照のH₂O処理ではほとんど硬度変化は起こらなかったが、スクロース処理によりエナメル質の脱灰による明瞭な硬度低下が観察された。

以上のようにう蝕誘発とスクロースの関係を実験医学的に調べる際には動物やヒトを用いた *in vivo* の試験が有用であった。スクロース存在下で歯の実質欠損を誘発させたり、エナメル質歯片の脱灰を起こさせることにより、う蝕誘発におけるスクロースの役割をより直接的に検証できるからである。なお、う蝕発生の分子メカニズムの解明には *in vitro* の研究が不可欠であることはいまでもない。

2-3. systematic reviewによる検証

糖質、特にスクロースがう蝕の誘発と進行に根本的に重要な役割を果たすことは多くの総説^{10, 14-17)}に報告されており、また前述のように疫学的または実験医学的検証でみられたように疑問の余地はない。しかし、近年の西欧においては1人当たりのスクロース消費量はあまり変化していないにも拘らず学童のう蝕罹患率は減少傾向にあり、また、米国においても1人当たりのスクロース消

費量は増加しているにも拘らず永久歯のう蝕罹患率は減少している。これらの原因は主にフッ化物の利用と口腔衛生の向上と考えられている^{17, 18)}。フッ化物を中等度～高度に利用している国において、スクロース消費とう蝕リスクの関係がどのようになっているのかをsystematic reviewで検討した報告がある¹⁹⁾。1980年から2000年までの英文論文で、キーワードとしてう蝕とのセットで、集団、糖、スクロース、フルクトース、グルコース、二糖類、単糖類、高フルクトースコーンシロップ、コーンシロップ、食経験、食餌インタビュー、食餌アンケート、甘味料、菓子、キャンデー、蜂蜜、スポーツドリンクを含む論文について検索した。用いたデータベースはMedlineとEMBASEである。最初に809論文が検索されたが、タイトルと要旨から不適切な論文を除いて134論文が残り、さらに除外/採用条件に合致する69論文を研究目的、被験者数など12項目からなるクオリティスコア (Max 100) で表した。最終的にスコア55以上の36論文について詳細に調べた。その結果、スクロース消費とう蝕発生との間に強い関連性の認められたのは2論文、中等度の関連性がみられたのは16論文、関連性がないか弱いのが18論文であった (表2)。以上より、フッ化物を中等度から高度に利用している国では、従来言われているよりもスクロース消費とう蝕発生との間の関連性が弱いことがわかった。しかし、半数の論文ではスクロース消費とう蝕発生との関連性が強い～中等度である。フッ化物を利用しているからスクロース消費について考慮しないでよいというわけではない。依然としてスクロース消費をコントロールすることがう蝕予防にとって重要であることに変わりはない。とくにフッ化物を取り入れていない国ではなおさらである。

3. その他の糖質のう蝕誘発性

表3、表4はそれぞれ各種オリゴ糖の性状、各種糖アルコールの性状を示したものである¹⁹⁾。スクロースの構造異性体であるパラチノース、トレハロースは動物実験によってもう蝕をほとんど誘発しないことが確かめられている²⁰⁾。カップリングシュガー、イソマルトオリゴ糖、パノースオリゴ糖は混在する発酵性糖質のため、スクロースよりも弱いながら実験動物にう蝕を誘発させる²⁰⁾。糖アルコールのソルビトール、マンニトールはミュータンスレンサ球菌によってごく緩やかに発酵されるが、そ